

学校编码: 10384

分类号_____密级

学号: 24520091152957

UDC

厦 门 大 学

____ 硕 士 ____ 学 位 论 文

心磷脂对延迟整流钾离子通道的调控及其在 甲亢心脏功能变化中的作用

The regulation of cardiolipin on the delayed rectifier potassium
channels and their role in hyperthyroid cardiac function

吴剑军

指导教师姓名: 叶本兰 教授

专 业 名 称: 生理学

论文提交日期:

论文答辩时间:

学位授予日期:

答辩委员会主席:

评 阅 人：

2012 年 5 月

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为(心磷脂在甲亢性心脏功能变化中的作用及其钾离子调控途径的作用机制)课题(组)的研究成果,获得(国家自然科学基金 81170727 号项目)课题(组)经费或实验室的资助,在(厦门大学医学院生理学科)实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名)：

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

（ ） 1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，于
年 月 日解密，解密后适用上述授权。

（ ） 2. 不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月 日

厦门大学博士论文摘要库

缩略语索引

英文缩写	英文全名	中文全名
H9c2	H9c2(2-1)	大鼠心肌细胞
DMSO	dimethyl sulfoxide	二甲基亚砷
T4	3,5,3',5'-tetraodothyronine	四碘甲腺原氨酸
CL14:0	Cardiolipin14:0	心磷脂 14:0（饱和）
CL18:1	Cardiolipin18:1	心磷脂 18:1（不饱和）
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Media	DMEM 细胞培养基
FBS	Fetal Bovine Serum	胎牛血清
HBSS	Hank's Balanced Salt Solution	Hank's 平衡盐溶液
PBS	Phosphate Buffered Saline	磷酸盐缓冲液

摘要

甲亢性心脏病是常见的疾病之一，甲状腺激素对心脏功能影响的机制复杂。课题组前期的研究表明心磷脂参与了甲亢性心脏病的病理过程。延迟整流钾离子通道是心肌细胞的一种重要的离子通道，是心肌细胞动作电位复极化的主要离子流，决定动作电位的时程、有效不应期的长短，与心率、心律关系密切，且近期的文献报道其还可能与心肌细胞容积调节以及甲亢性心肌肥厚有关，而心磷脂是心肌细胞重要的脂质成分，因此，我们拟通过本实验探讨甲状腺激素是否可以通过心磷脂作用影响细胞的延迟整流钾离子通道，从而引起心脏的形态与功能的变化。

本文采用 H9c2 心肌细胞株体外培养实验模型，应用膜片钳电生理实验技术，从心肌细胞膜电容和全细胞延迟整流钾离子通道电流的角度探讨（1）甲状腺激素（T4）的作用与心磷脂的作用是否一致；（2）在心磷脂（CL）的作用中，饱和心磷脂（CL14:0）和不饱和心磷脂（CL18:1 含有一个双键）的作用之间的区别。结果发现：

一、T4 促进体外培养的 H9c2 心肌细胞生长，细胞形态显著增大，且细胞的膜电容也相应增加。CL 对心肌细胞膜电容的作用与 T4 一致，也促进细胞膜电容增加，但以饱和 CL14:0 作用更显著。

二、T4 显著增加 H9c2 心肌细胞的延迟整流钾离子通道电流密度。饱和心磷脂 CL14:0 的作用与 T4 一致，而不饱和心磷脂 CL18:1 在某些电压下可使延迟整流钾离子通道电流密度有一定程度减少。

三、在通道活动的动力学过程方面，T4 和 CL14:0 都使心肌全细胞延迟整流钾离子通道电流的激活、失活过程加快。而 CL18:1 的作用不尽一致。

上述实验结果与前期的研究综合表明，CL 可能通过影响细胞膜延迟整流钾离子通道活动而参与 T4 引起的心肌细胞功能与形态的变化，其中以饱和的 CL 的作用为主。至于饱和与不饱和的 CL 作用差别的原因，可能与其不饱和双键有关，详细内容有待于进一步研究。

关键词： 甲亢 心肌细胞 心磷脂 钾离子通道

Abstract

Hyperthyroid heart disease is a common complex disease. The mechanism of thyroid hormone effect on cardiac function is complex. Our group pre-studies have shown that cardiolipin is involved in the pathological process of the hyperthyroid heart disease. Delayed rectifier potassium channels of myocardial cells is an important ion channels, which is the major component of cardiac myocyte repolarization current, determining the duration of the action potential and the length of effective refractory period. The latter two is closely related with heart rate and cardiac rhythm. Recent literature reports that the delayed rectifier potassium current may also be concerned with the regulation of myocardial cell volume and hyperthyroid myocardial hypertrophy. Cardiolipin is the major lipid components of the myocardial cells. Therefore, in this study our purpose is to explore whether the cardiolipin affect the delayed rectifier potassium channels in cells, causing changes in cardiac morphology and function.

Using the H9C2 cardiac cell lines in vitro experimental model, patch clamp technique was applied to investigate the perspective of the myocardial cell membrane capacitance and whole-cell delayed rectifier potassium current, to discuss (1) the role of thyroid hormone and the role of cardiolipin; (2) the role difference between saturated cardiolipin (CL14:0) and unsaturated cardiolipin (CL18:1, which contains a double bond), The results showed that:

1.T4 promote H9C2 cardiac cell growth in vitro. The cell morphology was significantly increased, with a corresponding increase in cell membrane capacitance. The effect of CL on myocardial cell membrane capacitance is the same as that of T4. But the effect of saturated CL (14:0) is far more potent than that of unsaturated CL (18:1).

2.T4 increases the delayed rectifier potassium current density significantly in H9c2 myocardial cell. The effect of CL (14:0) is the same. While the delayed rectifier potassium current density is reduced by CL (18:1) to a certain extent under certain voltage.

3. T4 and CL (14:0) speed up the activation and inactivation process of the cardiac whole cell delayed rectifier potassium current. While CL (18:1) had not significant impact in the delayed rectifier potassium current.

The results above indicate that CL have significant effect on the delayed rectifier K^+ channel activity, which may be one of the mechanisms involved in T4-induced changes of cardiac cell function and morphology. As for the role difference between saturated and unsaturated cardiolipin, it may be due to the unsaturated double bond, and need to be further studied.

Keywords: Hyperthyroidism; Myocardial cells; Cardiolipin; Delayed Rectifier Potassium channels

目 录

缩略语索引	I
摘 要	II
ABSTRACT	III
第一章 前言	1
第二章 实验方法	5
2.1 材料与设备	5
2.2 方法与步骤	7
2.3 数据分析	12
第三章 实验结果	14
3.1 T4 和 CL 对体外培养的大鼠心肌 H9c2 细胞大小形态的影响	14
3.2 T4 和 CL 对体外培养的大鼠心肌 H9c2 细胞膜电容的影响	15
3.3 T4 和 CL 对心肌全细胞充分激活的延迟整流性钾离子通道电流的影响	17
3.4 T4 和 CL 对心肌全细胞延迟整流性钾离子通道电流充分激活时间的影响	23
3.5 T4 和 CL 对心肌全细胞延迟整流性钾离子通道电流失活过程的影响	25
第四章 讨论	30
结 论	34
参 考 文 献	35
文献综述	38
致 谢	49

Table of Contents

Abbreviation	I
Abstract in Chinese	II
Abstract in English.....	III
Chapter 1 Introduction	1
Chapter 2 Material and method.....	5
2.1 Material and instrument	5
2.2 Method.....	7
2.3 Statistics	12
Chapter 3 Results	4
3.1 Effects of T4 or CL on the size and shape of cultured rat cardiac H9c2 ...	14
3.2 Effects of T4 or CL on membrane capacitance recorded from H9c2	15
3.3 Effects of T4 or CL on the delayed rectifier potassium currents in H9c2 ..	17
3.4 Effects of T4 or CL on the full activation time of delayed rectifier potassium currents in H9c2.....	23
3.5 Effects of T4 or CL on the inactivation process of delayed rectifier potassium currents in H9c2	25
Chapter 4 Discussion	30
Conclusion	34
Reference	35
Review	38
Acknowledgements.....	49

第一章 前言

甲亢是一类常见的代谢紊乱性疾病，对心脏功能影响显著，可以直接引起心脏的形态、功能的变化，其主要表现：心率增快、心肌代谢加速、心肌收缩力增强、心肌变性肥大，甚至心脏扩大、心律失常、心力衰竭，其机制复杂。近年的研究表明，甲状腺激素除了与细胞核内受体结合外，在核糖体、线粒体、细胞膜都有其结合位点，因此，其不仅影响蛋白的转录，对转录后的过程、线粒体的生物氧化作用以及细胞膜的转运功能均有影响。其中，对甲状腺激素刺激氧的消耗与物质的利用研究较为深入，对线粒体的生物氧化作用的影响过程较为明确。对于甲状腺激素影响心肌细胞蛋白功能方面的了解主要包括甲状腺激素：①作用于核受体影响一些功能蛋白的表达；②增加心肌细胞膜上 β -肾上腺素能受体的数量与亲和力，提高心肌细胞对儿茶酚胺类激素的敏感性；直接或间接兴奋腺苷酸环化酶，通过第二信使cAMP途径影响细胞功能；③调节钙离子通道、钙释放通道、钙调蛋白等，通过钙离子、钙调神经磷酸酶系统等途径影响细胞功能；④通过多种离子通道以及MAPKs、PKC、PI3、JAK-STAT等多个信号系统途径调控细胞功能。

甲状腺激素对心脏功能影响的机制复杂，影响细胞能量代谢，还调节一些膜蛋白的功能，而这些功能性膜蛋白镶嵌在膜脂质双分子层中，因此，探讨膜脂质对于膜蛋白功能的影响十分必要。心磷脂是分布在线粒体内膜的一种重要脂质，也是一种重要的生物能学信号分子，在一些病理状态下，心磷脂的含量会发生变化，甚至可以从线粒体内膜上“迁移”到线粒体外膜和细胞膜上。而且，最近的几项研究结果表明心磷脂在甲状腺功能紊乱中起作用：

(1) Cavallo A 等人最近(2011年8月)报道：甲状腺功能减退大鼠肝脏线粒体的心磷脂含量减少，这一变化可以通过补充甲状腺激素而逆转。与之相吻合的结果是，我们近期的实验显示：给小鼠注射甲状腺激素制成甲亢模型，发现其心肌显著增厚的同时，心肌细胞的心磷脂含量显著增加。这两个从甲亢与甲减的正、反两方面的实验模型中得出的结果均表明：甲状腺功能紊乱与心磷脂变化关系密切。

那么，上述这些研究结果中，心肌细胞的心磷脂含量增高是仅仅伴随着甲状腺功能亢进产生的一个结果呢？还是直接参与了甲亢性心脏变化的病理过程，成为构

成甲亢心脏病的病理机制的一部分？对于这个问题，我们同美国宾州大学 Roger Yu 教授的实验室一起进行了下述研究：

(2) 将小鼠的 ALCAT1 (Acy1-CoA:lysocardiolipin acyltransferase-1, 一种参与修饰心磷脂合成的多聚甘油磷酸酯酰基转移酶) 的基因敲除, 然后连续 10 天每天腹腔注射 T4 ($10 \mu\text{g}/10\text{g}$ 体重) 制成甲亢模型, 发现其在体心脏功能的变化以及心肌组织切片的形态学变化均比正常小鼠注射同等剂量 T4 后的变化显著减轻。这一结果表明, 心磷脂参与了甲亢性心脏功能变化的病理过程, 是构成其病理变化的机制的一部分, 而不只是一个伴随产生的结果。

本研究拟在上述的基础上进一步探讨心磷脂在甲亢性心功能变化中的作用机制。

在维持心脏功能稳定的调控机制中, 钾离子的调控是重要的途径之一。

在生理电压范围内, 心肌细胞外向钾离子电流是形成心肌静息电位的主要电流, 静息电位接近心肌细胞膜两侧钾离子的平衡电位。同时, 钾离子电流还是心肌细胞动作电位复极的主要电流。心肌细胞动作电位正常时程对控制心肌收缩和防止心肌期前兴奋十分重要。动作电位的波形是多种离子电流在不同时间激活和失活精确协调的最终结果, 而钾离子电流几乎参与了动作电位形成各个阶段。

心肌钾离子通道是跨心肌细胞膜蛋白, K^+ 离子依赖跨细胞膜电化学梯度通过通道蛋白形成钾电流。钾电流调节心肌静息电位、起搏细胞频率以及动作电位的形状和持续时程。另外, 钾通道还是神经递质和激素的作用靶点, 通过延长心肌动作电位和有效不应期, 它还可作为防止和抑制心律失常药物的作用位点。在人类心脏, 钾离子通道主要包括电压门控性通道, 比如快激活和快失活的瞬时外向电流 (I_{to1})、延迟整流钾电流, 包括超快 (I_{Kur}), 快 (I_{Kr}) 和慢 (I_{Ks}) 三个组分的整流钾电流; 配体门控性钾通道, 它包括: ATP 敏感钾通道和乙酰胆碱激活钾通道; 漏电通道。组织和解剖学差异与钾离子通道表达差异有关, 这些差异导致心肌不同解剖部位动作电位时程不同, 也是影响心率、胞内信号传导、以及一些药物和心血管疾病的重要原因。目前发现越来越多的药物抑制钾离子通道而导致动作电位时程的显著延长 (如获得性长 QT 间期综合症) 和扭转性室速, 表现为显著的多形性室性心动过速。

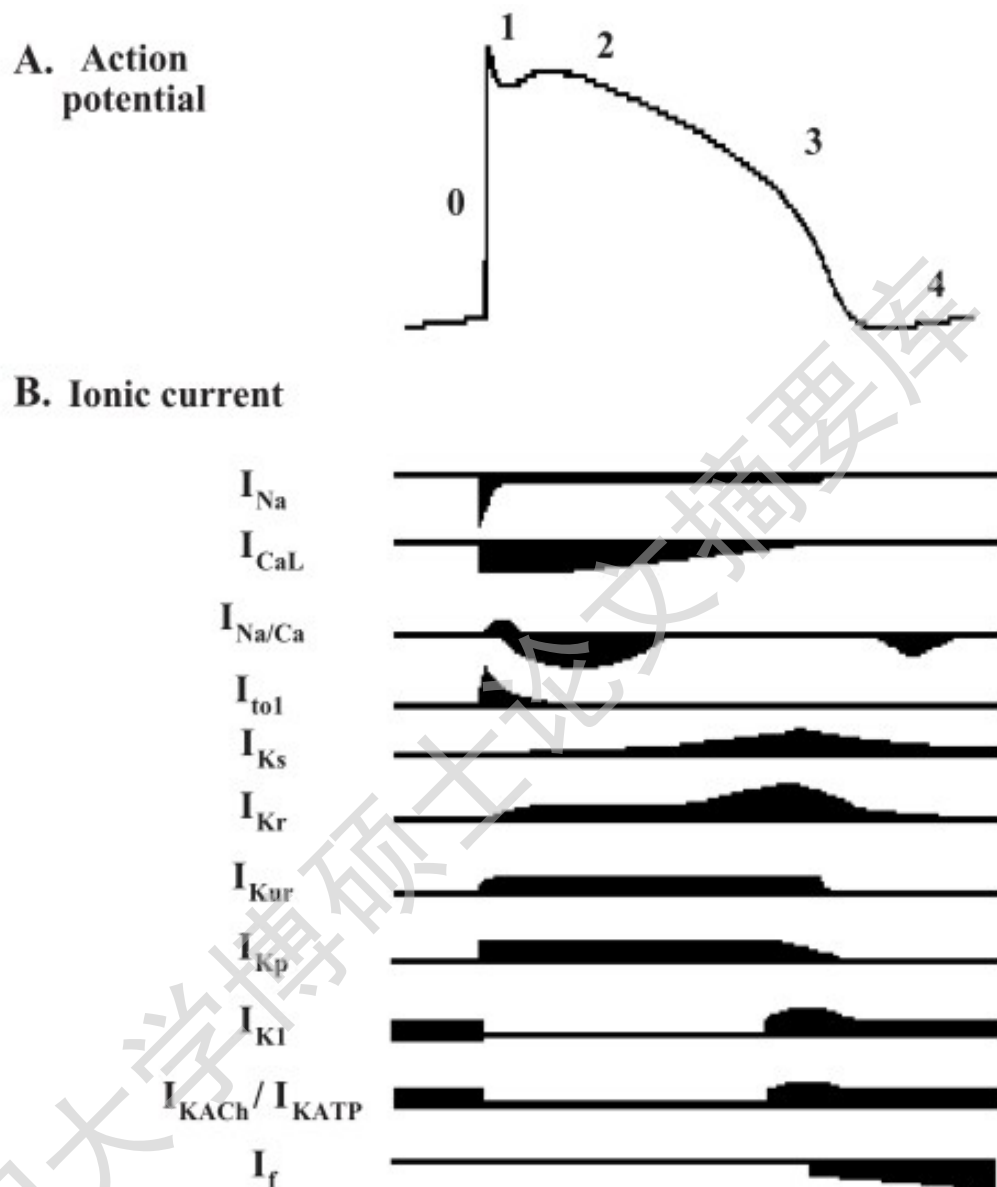


图 1.1 离子通道电流与动作电位

Fig. 1.1 Cardiac action potential(A) and the schematic representation of the major ionic currents (B) contributing to its waveform. The amplitudes of the depolarizing (downward) and repolarizing (upward) currents are not on the same scales .

图 1.1 展示参与动作电位形成的各种离子电流大小及持续时长和动作电位的关系。心房和心室细胞初始上升支（0 相）源于快速内向钠电流（ I_{Na} ）的激活。初始快速复极（1 相）则是快速电压依赖性 I_{Na} 通道的失活， I_{to1} 和 I_{Ku} 激活的结果。在 3 相内向的除极钠电流缓慢失活，L-型钙通道(I_{CaL})被延迟整流钾电流(I_{Kur} , I_{Kr})

和 I_{Ks}) 各组分平衡。复极 3 相末期是由于 I_{Kr} , I_{Ks} 和 I_{K1} 电导的增大。 I_{K1} 延迟整流性钾离子电流还主要参与静息电位的形成和维持。

本研究从延迟整流性钾离子通道活动的角度, 探讨心磷脂在甲亢性心功能变化中的作用机制。

第二章 实验方法

2.1 材料与设备

2.1.1 实验细胞

大鼠心肌 H9c2(2-1)细胞，购自上海中科院细胞库。

2.1.2 实验仪器与设备

(1) 膜片钳系统：

膜片钳放大器 EPC10	HEKA, German
倒置显微镜 Nikon	Nikon Japan
微操纵器 MP--285	Sutter Instrument Company, America
防震台 LSXPT	江西连胜实验装备有限公司

(2) 辅助设备：

电极拉制仪 PIPS	HEKA, German
PH 计 320PHMet	METTLERTOLEDO, Switzerland
恒温水浴锅 HH--S	江苏金坛县医疗仪器厂
蠕动泵 BT--100 型	上海青浦沪西仪器厂
CO ₂ 细胞培养箱 Forma Series2 HEPE class 2	Thermo America
洁净工作台 (SW--CJ--ZFD)	苏州安泰空气技术公司
电热恒温鼓风干燥箱 (DHG--9146A)	上海精宏实验设备公司
-20℃冰箱 (BCD--602WF)	青岛海尔股份有限公司
pH 计 (pH720)	WTW , German
漏点渗透压仪 (5520)	WESCOR, America
细胞培养皿 (35mm ×10mm)	杭州生友生物技术有限公司
真空抽滤除菌装置 (MITYVAC 8D60)	NALGENE, America

2.1.3 试剂

DMEM 细胞培养基	美国 GIBCO 公司
胎牛血清 (FBS)	美国 GIBCO 公司
0.25%胰蛋白酶	美国 GIBCO 公司
PBS 缓冲液粉末	美国 GIBCO 公司
100×青链霉素 (双抗)	美国 Hyclone 公司
DMSO (dimethyl sulfoxide)	美国 Sigma 公司
HBSS	美国 invitrogen 公司
葡萄糖	汕头市西陇化工厂有限公司
EGTA	美国 Sigma 公司
KCL	美国 Sigma 公司
HEPES	美国 Sigma 公司
CaCL ₂ ·2H ₂ O	美国 Sigma 公司
T4	圣克鲁斯生物技术 (上海) 有限公司
CL14:0	Avanti polar lipids, inc.
CL18:1	Avanti polar lipids, inc.

2.1.4 实验溶液及配置

本论文研究所涉及的细胞培养用液及实验测试时所用到的液体的配置如下:

- (1) K 细胞外液(mmol/L): HBSS、Glucose 5.5, 用 0.22 μ m 的滤器过滤除杂除菌。
- (2) K 电极内液(mmol/L): KCl 135、HEPES 10、EGTA 10, 自由钙 1 μ M, PH7.4, 用 KOH 和 HCL 调节 PH 值, 用 0.22 μ m 的滤器过滤除杂除菌。
- (3) T4 溶液: 用 DMSO 溶解配成 80 μ M 的母液, 使用时在 2mL 心肌细胞培养基中加入 10 μ L T4 溶液, 终浓度为 400nM, 用 0.22 μ m 的滤器过滤除杂除菌。母液用 EP 盛放, 外围用锡箔纸包裹避光放在 4°C 冰箱内。
- (4) CL14:0: 用 DMSO 溶解配成 10mM 的母液, 控制配成的溶液加入培养基中孵育细胞时 DMSO 浓度小于 0.5% , 使用时在 2mL 心肌细胞培养基中加入 10 μ L CL14:0 溶液, CL14:0 终浓度为 50 μ M, 同时还用 0.22 μ m 的滤器过滤除杂除菌。母液用 EP 盛放, 外围用锡箔纸包裹避光放在 4°C 冰箱内。

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库